

Artículo original

Efecto inhibidor de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157:H7

María Liliana Roldán^{a,*}, José Luis Otero^b, Fernanda Villarreal^a, María Rosa Baroni^a, Marta Susana Carrasco^c, Claudia Álvarez^a, Karen Russell-White^c, Emilce de los Ángeles Méndez^a, Arturo Carlos Simonetta^c

^aCátedra de Bacteriología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. ^bDepartamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias. ^cCátedra de Microbiología y Biotecnología, Departamento de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Recibido 22 de diciembre de 2010; aceptado 25 de junio de 2011

Resumen: Se ha investigado, mediante estudios de cinética de muerte celular, el efecto inhibidor de una cepa de *Lactobacillus casei*, aislada de un alimento cárnico fermentado producido en la región santafesina (Argentina), y de su sobrenadante libre de células (SLC), frente a tres cepas de *Escherichia coli* O157:H7. La cepa de *L. casei* 206/1 se seleccionó sobre la base de resultados obtenidos en estudios previos donde, aplicando la técnica de agar spot, se determinó que su SLC produjo el mayor efecto inhibitorio sobre *E. coli* O157:H7. En los ensayos de cinética de muerte celular se observó una reducción significativa de las cepas de *E. coli* O157:H7 estudiadas, tanto en cocultivos como en el ensayo con el SLC, no detectándose bacterias viables luego de 24 horas de incubación. Estos resultados demuestran que cepas de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de un determinado ecosistema regional, pueden convertirse en una herramienta biotecnológica útil para controlar a *E. coli* O157:H7 en alimentos.

Palabras clave: *Lactobacillus casei*, *Escherichia coli* O157:H7 cinética de muerte, productos cárnicos.

Inhibiting effect of *Lactobacillus casei* 206/1 against *Escherichia coli* O157:H7

Abstract: Through the study of cell death kinetics, we have analyzed the inhibiting effect of a *Lactobacillus casei* strain isolated from a fermented meat product produced at the Santa Fe region in Argentina, and of its cell-free supernatant (CFS), against three *Escherichia coli* O157:H7 strains. The *L. casei* 206/1 strain was selected on the basis of results obtained in previous studies where using the agar spot technique, it was determined that CFS produced the greatest inhibitory effect over *E. coli* O157:H7. The studies of cell death kinetics showed a significant reduction of the *E. coli* O157:H7 strains tested, both in cocultures and in assays with CFS, and no viable bacteria were detected after 24-hours of incubation. These results show that lactic acid bacterial strains isolated from a determined regional ecosystem, can become a useful biotechnological tool for controlling *E. coli* O157:H7 in food.

Keywords: *Lactobacillus casei*, *Escherichia coli* O157:H7, death kinetics, meat products.

* Correspondencia:
E-mail: lroldan@fbc.unl.edu.ar

Introducción

Desde tiempos remotos las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido utilizadas en la preservación de los alimentos, cuya vida útil podía extenderse mediante procesos fermentativos dirigidos por estos microorganismos [1, 2]. Su carácter de GRAS (generally recognized as safe - sigla inglesa de la expresión “generalmente reconocidas como seguras”) ha permitido que se desarrollen numerosas líneas de investigación relativas a su utilización para asegurar la biopreservación de los alimentos. Así por ejemplo, la idea de utilizar péptidos antimicrobianos como las bacteriocinas,

como un obstáculo extra en un sistema de barreras para asegurar la calidad e inocuidad de los chacinados secos madurados, ha sido introducida en los últimos años, aunque no se ha desarrollado aún la utilización total de este concepto [3].

La selección de determinadas cepas de BAL con capacidad para extender la vida útil de algunos alimentos con potencial probiótico para animales y humanos, ha sido, al menos en parte, una consecuencia de su capacidad de producción de sustancias antimicrobianas tales como bacteriocinas, aldehídos, peróxidos, ácidos orgánicos, etc. [2, 4].

Las bacteriocinas son compuestos de naturaleza proteica

cuya actividad es ejercida generalmente, aunque no en forma exclusiva, sobre bacterias estrechamente relacionadas desde el punto de vista taxonómico con la cepa bacteriocinogénica [5-7]. Dentro de los patógenos que mostraron tener sensibilidad a la acción de estos compuestos se encuentra *Escherichia coli* O157:H7, importante agente etiológico de enfermedades transmitidas por los alimentos y del síndrome urémico hemolítico [8-11].

Existen diversas metodologías para detectar y caracterizar estas sustancias inhibitorias, basándose, la mayoría de ellas, en la difusión de las mismas a través de un medio de cultivo sólido para inhibir el desarrollo de un microorganismo sensible distribuido homogéneamente en él (ensayo de difusión en agar). Sin embargo, cuando se desea conocer la capacidad bactericida que estas sustancias podrían tener, resulta de mayor utilidad e interés determinar la cinética de muerte celular del microorganismo sensible a través de técnicas con cultivos mixtos (cocultivos), o con cultivos adicionados con el sobrenadante libre de células (SLC) obtenido de un cultivo de la bacteria bacteriocinogénica, en el que se encuentran los compuestos con actividad antimicrobiana [5, 7, 8, 9, 12].

De este modo, evaluando el efecto inhibitor de cepas de BAL por cinética de muerte celular sobre *E. coli* O157:H7, es posible comprender la dinámica metabólica de ambos microorganismos en un mismo medio de cultivo, y así proponer un nuevo rol biotecnológico de estas bacterias lácticas en la preservación de los alimentos frente a una posible contaminación con microorganismos patógenos.

El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto inhibitor de una cepa de *Lactobacillus casei*, aislada a partir de un alimento fermentado e identificada como 206/1, y de su SLC, frente a cepas de *E. coli* O157:H7 provenientes de distintos orígenes, mediante la técnica de determinación de la cinética de muerte celular.

Materiales y métodos

Cepas: La cepa de *L. casei* 206/1 se obtuvo de un aislamiento efectuado a partir de un alimento cárnico fermentado producido en la región Santa Fe (Argentina). En estudios previos, esta cepa presentó una buena capacidad de crecimiento y demostró tener una muy buena actividad inhibitoria, determinada con la técnica del agar spot (ensayo de difusión en agar) [13].

Las tres cepas de *E. coli* O157:H7 estudiadas, aisladas a partir de un alimento, un humano y tierra, fueron aportadas por el Servicio de Fisiopatología del ANLIS "Dr. C. Malbrán" (Buenos Aires, Argentina). Las mismas se identificaron de acuerdo a su procedencia u origen (fuente a partir de la cual fueron aisladas).

Todas las cepas se conservaron por congelamiento a -20°C , en los medios de cultivo recomendados para su desarrollo [agar MRS (Merck) para *L. casei*, y agar CLDE (Merck) para *E. coli*], adicionados con 15% (v/v) de glicerol.

Cinética de muerte de E. coli O157:H7 en cultivos mixtos en

medio líquido: A los fines de anular la incidencia de factores propios del medio de cultivo y de la capacidad que tengan los microorganismos para crecer adecuadamente en él, se evaluó tanto para *L. casei* 206/1 como para *E. coli* O157:H7 el crecimiento en caldo MRS (Merck) y caldo BHI (Merck). Se partió de cultivos incubados a 37°C durante una noche cuyas concentraciones celulares se ajustaron a 0,5 de la escala de Mc Farland, y se incubó cada microorganismo en ambos medios, en aerobiosis, durante 24 horas, realizando los respectivos conteos a tiempo 0 y a las 24 horas en agar MRS (Merck) para la BAL, y en agar CLDE (Merck) para las cepas de *E. coli* O157:H7. Dado que se observó un crecimiento óptimo tanto en caldo MRS (Merck) como en caldo BHI (Merck) para ambos tipos de microorganismos, y considerando que se buscaba evaluar el efecto de la BAL sobre la viabilidad de *E. coli* O157:H7, se decidió optar por el caldo MRS (Merck) para la propagación de los cultivos mixtos.

Las concentraciones iniciales de los cultivos de *L. casei* y de los de las tres cepas de *E. coli* O157:H7 fueron 1×10^6 UFC/mL y 1×10^5 UFC/mL, respectivamente. Se prepararon cultivos mixtos (cocultivos) de ambas especies bacterianas en una relación 1:1 [8, 9].

Se determinó la cinética de muerte de *E. coli* O157:H7 en los cultivos mixtos y, simultáneamente, se realizó la curva de crecimiento para cada una de las cepas en cultivos simples (controles).

Los cocultivos fueron examinados a 0, 7, 12 y 24 horas, tomando $500\mu\text{L}$ de muestra y realizando diluciones decimales en agua de peptona estéril al 0,1% (p/v), y los controles a 0, 12 y 24 horas, procediendo de la misma manera. Las muestras se sembraron por duplicado en agar MRS (Merck), para el conteo de *L. casei*, y en agar CLDE (Merck) para el conteo de *E. coli*. Todas las placas se incubaron 48 horas a 37°C , las de agar MRS (Merck) en atmósfera con 5-10% de CO_2 , y las de agar CLDE (Merck) en aerobiosis.

El número de colonias contadas (UFC/mL) fue expresado en órdenes logarítmicos. Utilizando este parámetro y el tiempo de incubación en horas, se graficaron las curvas de muerte de *E. coli* O157:H7, y las de crecimiento de *L. casei* 206/1 en los cocultivos. Simultáneamente se graficaron las curvas de crecimiento de los respectivos controles.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado, y los valores utilizados para trazar los gráficos son los promedios de los valores individuales obtenidos en cada ensayo.

Cinética de muerte de E. coli O157:H7 por adición del sobrenadante libre de células (SLC) de L. casei 206/1:

Obtención del sobrenadante libre de células (SLC): El SLC se obtuvo a partir de 100 mL de cultivo de *L. casei* 206/1 incubado a 37°C durante una noche, el que fue centrifugado a 7.000 rpm durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente el sobrenadante del cultivo fue concentrado diez veces por evaporación bajo vacío (rotavapor Büchi RE 111) a 70°C , y luego esterilizado por filtración, utilizando membranas Sartorius de $0,45\mu\text{m}$ de diámetro de poros. El

mismo se conservó a -20°C hasta su uso [7, 14].

Evaluación de la cinética de muerte en los cultivos de *E. coli* O157:H7 adicionados con SLC: Se prepararon tubos de ensayo con 20 mL de caldo MRS (Merck) inoculando cada uno de ellos con una cepa de *E. coli* O157:H7, y ajustando la turbidez de los mismos al valor 0,5 de la escala de McFarland. A cada tubo se le adicionó una alícuota del SLC (10% v/v) y se incubó a 37°C , en aerobiosis, durante 24 horas. Se realizaron tomas de muestra a 0, 3, 6, 9, 12 y 24 horas para realizar los conteos bacterianos.

Se prepararon los controles de cada cepa de *E. coli* O157:H7 en caldo MRS (Merck) y se incubaron a 37°C , en aerobiosis, durante 24 horas. Se realizaron conteos bacterianos a 0, 6, 12 y 24 horas. Los valores de los conteos se promediaron y se expresaron en órdenes logarítmicos. Utilizando este parámetro y el tiempo de incubación expresado en horas, se graficaron las curvas de muerte de *E. coli* O157:H7 por acción del SLC, y las curvas de crecimiento de los controles de las cepas de *E. coli* O157:H7.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los valores utilizados para trazar los gráficos son los promedios de los valores individuales obtenidos en cada ensayo.

Resultados

Cinética de muerte de *E. coli* O157:H7 en cultivos mixtos en medio líquido: En las figuras 1, 2 y 3 se observan las cinéticas de muerte de cada una de las tres cepas de *E. coli* O157:H7 en cocultivo con *L. casei* 206/1, así como las curvas de crecimiento de los respectivos controles.

Analizando las curvas de cinética de muerte de cada cepa de *E. coli* O157:H7 en cocultivo con *L. casei* 206/1, se observó que una vez que la BAL alcanza la etapa final de su fase exponencial de crecimiento, las sustancias antimicrobianas que ésta libera al medio alcanzan suficiente concentración como para ejercer su acción bactericida sobre el patógeno, razón por la cual a las 24 horas de cultivo ya no se detectó la presencia de *E. coli* O157:H7.

Cinética de muerte de *E. coli* O157:H7 en cultivos adicionados con el SLC de *L. casei* 206/1: En la figura 4 se observan las cinéticas de muerte de las cepas de *E. coli* O157:H7 cuando desarrollan en presencia del SLC de *L. casei* 206/1, así como las curvas de crecimiento de los respectivos controles.

En la misma puede comprobarse que, al incubar las cepas de *E. coli* O157:H7 durante 24 horas en presencia del SLC obtenido de cultivos de *L. casei* 206/1, éste ejerce una acción bacteriostática durante las primeras 12 horas de propagación, no permitiendo que el patógeno se desarrolle y manteniéndolo aproximadamente en los mismos niveles de concentración celular que presentaron los inóculos iniciales. Luego de ese tiempo la acción del SLC se convierte en bactericida, dado que al cabo de 24 horas de incubación no se detectaron células viables de ninguna de las tres cepas estudiadas de *E. coli* O157:H7.

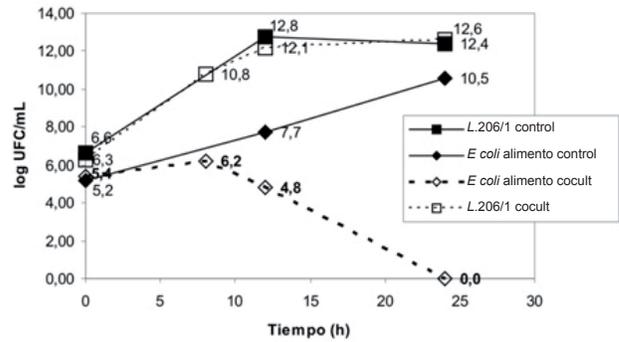


Figura 1. Cinética de muerte de *Escherichia coli* O157:H7 de origen alimentario en cocultivo con *Lactobacillus casei* 206/1.

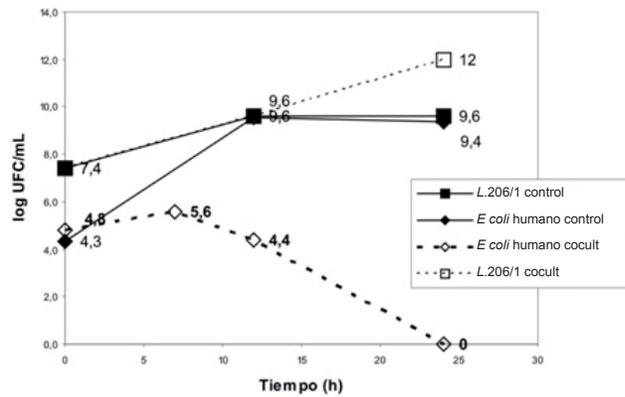


Figura 2. Cinética de muerte de *Escherichia coli* O157:H7 de origen humano en cocultivo con *Lactobacillus casei* 206/1.

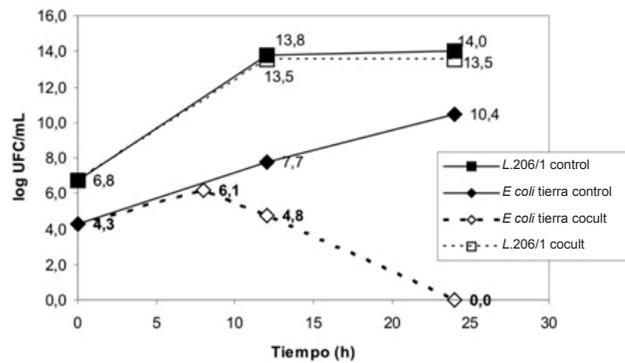


Figura 3. Cinética de muerte de *Escherichia coli* O157:H7 de una muestra de tierra en cocultivo con *Lactobacillus casei* 206/1.

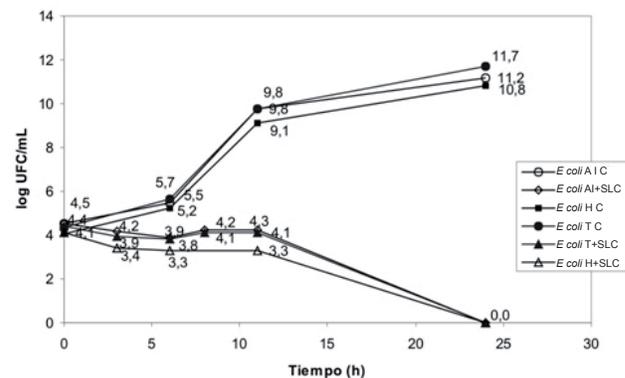


Figura 4. Cinética de muerte de *Escherichia coli* O157:H7 de origen alimentario, humano y de tierra frente al SLC de *Lactobacillus casei* 206/1.

Discusión

El nuevo concepto denominado biopreservación, para diferenciarlo de la preservación química de los alimentos, ha inducido a investigar características metabólicas de microorganismos que potencialmente se puedan utilizar en productos destinados al consumo humano o animal [15].

El género *Lactobacillus* genera día a día un creciente interés entre microbiólogos y tecnólogos dedicados a descubrir nuevas aplicaciones biotecnológicas y propiedades probióticas [2, 16-18]. Su actividad antibacteriana ha sido atribuida a un heterogéneo grupo de sustancias de tipo peptídico, ácido láctico entre otros ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno [8, 9, 12].

En lo que respecta a la cepa de *L. casei* 206/1 en estudio, se ha demostrado previamente, mediante estudios realizados aplicando la técnica del agar spot, que su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las tres cepas de *E. coli* O157:H7 es consecuencia de una combinación de sustancias de naturaleza peptídica junto a una acción parcial del peróxido de hidrógeno y de la acidez del medio [13]. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por otros investigadores tales como Työppönen *et al.* [3], Servin [11], Kociubinski *et al.* [12], Carrasco *et al.* [14], Vallejo *et al.* [15] y con lo informado por Vinderola y Reinheimer, [19] y por Friedrich-Karl [20], quienes proponen el uso de cepas de BAL productoras de sustancias antimicrobianas para prevenir la contaminación de diferentes matrices alimentarias con distintas especies de bacterias patógenas.

Del mismo modo, existen estudios previos que demuestran la acción inhibitoria de otras bacteriocinas producidas por BAL frente a *E. coli* O157:H7, cuando las mismas son combinadas con agentes quelantes como el tripolifosfato de sodio [21], o con aceites esenciales de origen vegetal, como el del cinamomo (árbol de la ciruela) [22].

Por otra parte, otros autores [23, 24, 25] han demostrado que bacteriocinas como Microcina J25, producida por bacterias no lácticas, son activas por sí mismas frente a *E. coli* O157:H7, así como frente a *Salmonella* spp. y *Shigella* spp.

Los resultados observados en los cocultivos de *L. casei* 206/1 con las tres cepas ensayadas de *E. coli* O157:H7 son muy similares a los obtenidos por otros investigadores tales como González *et al.* [8] y Canganella *et al.* [10]. Los primeros informaron que una cepa de *E. coli* en cultivos asociativos con cepas de *L. casei* y de *Lactobacillus acidophilus* comenzó su fase acelerada de muerte a partir de las 9 horas de cultivo. Por su parte, los segundos demostraron que una cepa de *E. coli* en cocultivo con una de *Streptococcus thermophilus* mostró una cinética de muerte muy pronunciada a partir de las 8 horas, mientras que con una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* este efecto ya se hizo evidente a partir de las 4 horas de cultivo: en ambos casos el comienzo de la fase de muerte acelerada de *E. coli* coincidió con el comienzo de la fase exponencial máxima de las cepas de BAL.

En lo que respecta al efecto, primero bacteriostático y

luego bactericida, causado por el SLC de *L. casei* 206/1 sobre los cultivos de las cepas de *E. coli* O157:H7 ensayadas, ha resultado coincidente con el hallado en otras investigaciones que estudiaron la acción de SLC obtenidos de cultivos de distintas cepas de BAL frente a otras especies bacterianas. Así, Müller *et al.* [7] encontraron un efecto similar del SLC obtenido de *L. plantarum* LP31 frente a una cepa de *Staphylococcus aureus*; Carrasco *et al.* [14] describieron resultados coincidentes para un SLC obtenido de cultivos de una cepa de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* frente a cepas de *S. aureus* y de *Pseudomonas* sp., mostrando esta última el mismo efecto frente a SLC obtenidos de cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y de *S. thermophilus*; y Carrasco *et al.* [17] describieron idéntico comportamiento para una cepa de *S. aureus* frente al SLC obtenido de *L. plantarum* Lp33.

Por el contrario, en otros casos se informó sólo de la existencia de efecto bacteriostático frente a *Listeria monocytogenes* [7, 17], o marcadamente bactericida desde las primeras horas de cultivo frente a *Pseudomonas* sp., *Bacillus cereus*, *E. coli*, *S. aureus* [7, 17, 26] y *Vibrio cholerae* 01 [5].

Conclusiones

Los resultados obtenidos demostraron que la cepa de *L. casei* ensayada podría ser utilizada como herramienta biotecnológica útil para impedir el desarrollo de *E. coli* O157:H7 en caso de contaminación de un producto alimentario, especialmente cárnico, con este patógeno, como también han informado previamente otros investigadores.

También se puede afirmar que la cepa de *L. casei* 206/1 creció satisfactoriamente en los tres cocultivos, demostrando de esta manera que la presencia de la bacteria patógena en el mismo medio de propagación no influyó en su desarrollo ni en su actividad metabólica.

Estos resultados son alentadores, ya que cepas de BAL aisladas a partir de un ecosistema regional, pueden convertirse en una herramienta biotecnológica útil para controlar *E. coli* O157:H7 en la producción de alimentos seguros, libres de patógenos emergentes. Además, esta potencial aplicación en la biopreservación alimentaria podría lograrse tanto mediante la incorporación del SLC a diferentes matrices alimentarias o a películas poliméricas comestibles utilizadas para el envasado de alimentos, mediante la integración de las cepas de BAL seleccionadas a los fermentos utilizados en la elaboración de alimentos tales como productos cárnicos, lácteos o vegetales fermentados.

Agradecimientos

El presente trabajo ha sido realizado con subsidios otorgados a Proyectos de Investigación pertenecientes a las Programaciones C.A.I.+D. 2005 de la Universidad Nacional del Litoral (Argentina). Los autores agradecen a la Dra. Marta Rivas, del Servicio de Fisiopatología del ANLIS "Dr. Carlos Malbrán" (Buenos Aires, Argentina),

por la provisión de las cepas de *E. coli* O157:H7.

Referencias

- Lee Y, Nomoto K, Salminen S, Gorbach SL. Handbook of probiotics. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1999.
- Stanton C, Desmond C, Fitzgerald G, Ross RP. Probiotic health benefits - reality or myth? Aust J Dairy Technol. 2003; 58:2.
- Työppönen S, Petäjä E, Mattila-Sandholm T. Bioprotective and probiotics for dry sausages. Int J Food Microbiol. 2003; 83:233-44.
- Xanthopoulos VE, Litopoulou-Tzanetaki, Tzanetakis N. Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. Food Microbiol. 2000; 17:205-15.
- Simonetta A, Moragues L, Frisón L. Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*. Lett Appl Microbiol. 1997; 24:139-43.
- Müller D, Carrasco M, Simonetta A, Beltramini L, Tonarelli G. A synthetic analog of Plantaricin 149 inhibiting food-borne pathogenic bacteria: evidence for alpha-helical conformation involved in bacteria-membrane interaction. J Peptide Sci. 2007; 13:171-8.
- Müller D, Carrasco M, Tonarelli G, Simonetta A. Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* Lp 31 strain isolated from dry-fermented sausage. J Appl Microbiol. 2009; 106: 2031-40.
- González SN, Apella MC, Romero NC, Nader de Macías ME, Oliver, G. Inhibition of enteropathogens by lactobacilli strains used in fermented milk. J Food Protect. 1993; 56:773-6.
- Ross GR, González S, Gusils C. Caracterización de una sustancia inhibitoria tipo bacteriocina producida por *Lactobacillus salivarius* subs. *salivarius*. Alim Latinoam. 2007; N° 269:72-7.
- Canganella F, Ovidi M, Paganini S, Vettriano AM, Bevilacqua L, Trovatielli L.D. Survival of undesirable micro-organisms in fruits yoghurts during storage at different temperatures. Food Microbiol. 1998; 15: 71-7.
- Servin A L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiol. Rev. 2004; 28:405-40.
- Kociubinski G, Pérez P, Añón MC, De Antoni G. A Method of Screening for Highly Inhibitory Lactic Acid Bacteria. J Food Protect. 1996; 59:739-45.
- Roldán L, Otero JL, Carrasco M, Baroni MR, Álvarez C, Russell White K y col. Utilización de bacterias ácido lácticas para el control de *Escherichia coli* O157:H7 en productos cárnicos. Rev Argent Microbiol. 2007; 39:125.
- Carrasco M, Scarinci H, Simonetta A. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Argentinian dairy products. Aust J Dairy Technol. 2002; 57:15-9.
- Vallejo M, Etchechoury V, Horiszny C, Marguet E. Inhibición de *Escherichia coli* O157: H7 por cepas de *Lactobacillus* aisladas de queso bovino. Analecta Veterinaria. 2009; 29 :15-9.
- Puhan Z. Effect of probiotic fermented dairy products in human nutrition. Industria Latte. 1999, 35:3-11.
- Carrasco M, García M, Scarinci H, Simonetta A. Characterization of bacteriocin-like substances produced by *Lactobacillus plantarum* strains. Microbiol Alim Nutr 1999; 17: 49-58.
- Müller D, Carrasco M, Simonetta A, Tonarelli G. Bioactive peptides produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*. Characterization and partial purification. En: Lebl M y Houghten RA (eds.). Peptides: The Wave of the Future, California (USA): American Peptide Society y Kluwer Academic Publishers. 2001; pp 772-775.
- Vinderola CG, Reinheimer JA. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative *in vitro* study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Res. Int. 2003; 36: 895-904.
- Friedrich-Karl L. Utilization of microbes to process and preserve meat. Meat Sci. 2000; 56:105-15.
- Ananou S, Gálvez A, Martínez-Bueno M, Maqueda M, Valdivia E. Synergistic effect of enterocin AS-48 in combination with outer membrane permeabilizing treatments against *Escherichia coli* O157:H7. J Appl Microbiol. 2005; 99:1364-72.
- Yuste J, Fung DY. Inactivation of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice by a combination of nisin and cinnamon. J Food Prot. 2004; 67:371-7.
- Blond A, Peduzzi J, Goulard C, Chiuchiolo MJ, Barthelemy M. The cyclic structure of microcin J25, a 21-residue peptide antibiotic from *Escherichia coli*. Eur J Biochem. 1999; 259:747-55.
- Sable S, Pons AM, Gendron-Gaillard S, Cottenceau G. Antibacterial activity evaluation of microcin J25 against diarrheagenic *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 2000; 66:4595-7.
- Salomon RA, Farias RN. Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1992; 174:7428-35.
- Carrasco M, Scarinci H, Simonetta A. Inhibitory spectrum of bacteriocin-like substances produced by *Lactobacillus plantarum* strains. Microbiol Alim Nutr. 1997; 15:299-395.